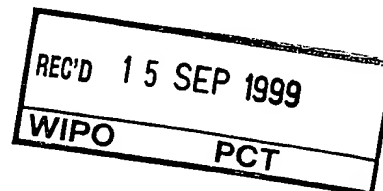


82
KONINKRIJK DER



4
PCT/NL 99/00470
NL99/470
09/744230
NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 21 juli 1998 onder nummer 1009703,
ten name van:

INSTITUUT VOOR DIERHOUDERIJ EN DIERGEZONDHEID (ID-DLO)

te Lelystad

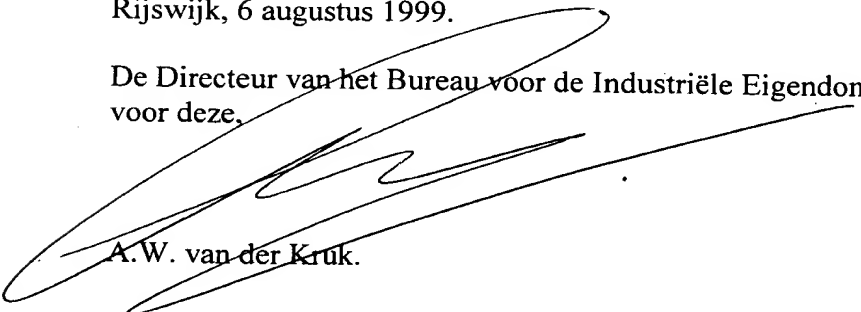
een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Werkwijze voor het vervaardigen van een preparaathouder voor chemische of biochemische tests",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 6 augustus 1999.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,


A.W. van der Kruk.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

1009709

K. d. I. E.

11 JUL 1998

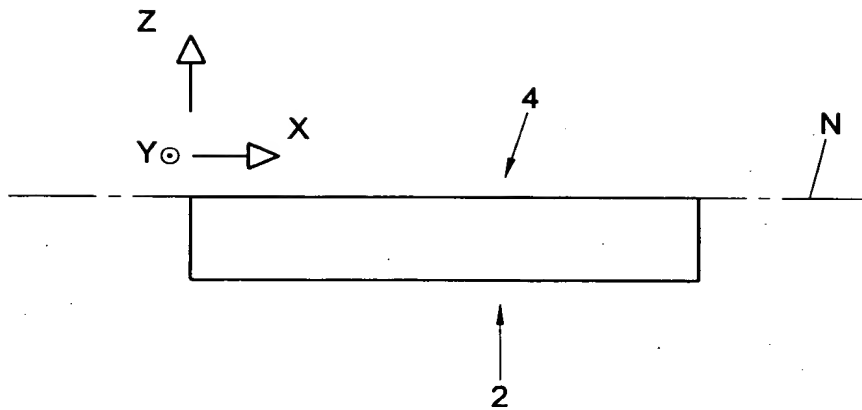
UITTREKSEL

Werkwijze voor het vervaardigen van een preparaat-
drager, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij chemisch
en biochemisch onderzoek, waarbij:

- op ten minste één oppervlak van een dragerbasis een laag kunststof wordt aangebracht,
- waarbij de kunststoflaag thermisch en/of chemisch wordt behandeld, zodanig dat de oppervlakteruwheid van de naar de dragerbasis gekeerde zijde van de kunststof wordt verlaagd, terwijl deze niet aan de dragerbasis hecht,
- waarna de kunststof van de dragerbasis wordt afgenomen, waarbij het vrijkomende, relatief gladde oppervlak van de kunststof een drageroppervlak vormt.

7

1009703



VO 2234

Titel: Werkwijze voor het vervaardigen van een
preparaathouder voor chemische of biochemische
tests.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een preparaatdrager, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij chemisch en biochemisch onderzoek.

5 Bij biochemisch onderzoek wordt veelal gebruik
gemaakt van zogenaamde miniwells in bijvoorbeeld microtiter
platen, waarbij in elke miniwell een kleine hoeveelheid te
onderzoeken preparaat wordt gebracht, wordt behandeld en
wordt bekeken. Met behulp van markers kan daarbij worden
10 vastgesteld of bepaalde bindingen in de betreffende
miniwells hebben plaatsgevonden, waardoor de aard van het
te onderzoeken preparaat kan worden bepaald.

Een dergelijke werkwijze heeft als voordeel dat een
uniforme verdeling van het preparaat kan worden verkregen,
15 waardoor verschillende tests tegelijkertijd op eenzelfde
preparaat en/of dezelfde tests op verschillende preparaten
kunnen worden uitgevoerd. Een dergelijke werkwijze heeft
echter als nadeel dat het minimaal volume van een miniwell
relatief groot is, bijvoorbeeld ongeveer 3 microliter,
20 hetgeen betekent dat relatief veel preparaat nodig is voor
het uitvoeren van de verschillende tests terwijl bovendien
slechts een beperkt aantal microwells op een bepaald
oppervlak kan worden aangebracht. Dit betekent dat een
dergelijke werkwijze relatief veel ruimte op een
25 preparaatdrager vergt.

Voorts is een werkwijze bekend waarbij gebruik wordt
gemaakt van pinnen waarop een te onderzoeken preparaat
wordt aangebracht, welke pinnen vervolgens in de holte van
een microtiterplaat opgenomen vloeistoffen kunnen worden
30 gedoopt, zodanig dat al dan niet bindingen tussen het te
onderzoeken preparaat en de vloeistoffen in de
verschillende holten plaatsvinden. Ook een dergelijke

werkwijze heeft als nadeel dat voor een relatief klein aantal te onderzoeken preparaatdelen een preparaatdrager met een relatief groot oppervlak nodig is.

De microtiterplaten en pinnen, toegepast bij
5 bovengenoemde werkwijze, kunnen zijn vervaardigd uit kunststof, bijvoorbeeld polyetheen, welke kunststof eventueel is voorzien van een reactieve stof, zodanig dat specifieke bindingen daaraan mogelijk zijn. De gebruikte kunststof heeft een relatief geringe vlakheid. De lokale
10 vlakheid is aanmerkelijk geringer dan de lokale vlakheid van bijvoorbeeld een glazen- of mica-oppervlak. Lokale vlakheid dient in deze begrepen te worden als vlakheid van een relatief klein oppervlak, bijvoorbeeld in de orde van vierkDit betekent dat daaraan gebonden elementen uit het
15 preparaat, voorzien van een marker, relatief moeilijk waarneembaar zijn, met name doordat scherpstelling van een voor de analyse daarvan te gebruiken microscoop of fotografische inrichting daarop slecht mogelijk is. Immers, als gevolg van de relatief hoge ruwheid van het oppervlak
20 waarop de elementen zijn gebonden zullen deze in een richting haaks op het betreffende oppervlak gezien ten opzichte van elkaar zijn versprongen, zodat focuseren daarop wordt bemoeilijkt. Dit betekent dat het frontaal oppervlak van elke te analyseren holte of pin relatief
25 groot dient te zijn teneinde voldoende onderscheidend vermogen te hebben. Dit staat verdere schaalverkleining in de weg.

De uitvinding beoogt een werkwijze van de in de aanhef beschreven soort, waarbij de genoemde nadelen van de
30 bekende werkwijzen zijn vermeden, met behoud van de voordelen daarvan. Daartoe wordt een werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 1.

Door te voorzien in een preparaatdrager met een
35 bijzonder vlak kunststof drageroppervlak, geschikt voor binding van de gewenste elementen in een preparaat wordt

het voordeel bereikt dat bijzonder dicht bij elkaar te detecteren elementen kunnen worden gebonden die toch van elkaar te onderscheiden zijn met bijvoorbeeld een microscoop of een CCD-camera of dergelijke inrichting.

5 Kunststof is daarbij in principe een gunstig materiaal voor het vervaardigen van preparaatdragers, doordat het relatief eenvoudig te bewerken is en relatief sterk is, terwijl een goede binding van verschillende preparaten, in het bijzonder biochemische preparaten zoals
10 virussen, antigenen, peptiden en dergelijke daaraan kan worden verkregen.

Verrassenderwijs is thans gebleken dat met een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding een zodanig glad kunststof oppervlak kan worden verkregen dat dit wel,
15 althans veel beter geschikt is als draagoppervlak voor preparaten bij dergelijk onderzoek. Door de kunststof laag, thermisch of chemisch behandeld, tegen een oppervlak van een dragerbasis met een geschikte oppervlakteruwheid te vormen blijkt namelijk dat daardoor de oppervlakteruwheid
20 van het tegen de dragerbasis gelegen oppervlak aanmerkelijk kan worden verlaagd. Hiermee kan bijvoorbeeld een verlaging van de oppervlakteruwheid worden verkregen met een factor 5 tot 20 of meer. Dit betekent dat elementen van een preparaat die aan het drageroppervlak worden gebonden
25 bijzonder kleine afmetingen kunnen hebben, terwijl daarmee toch op optimale wijze de aanwezigheid daarvan kan worden vastgesteld op basis van bijvoorbeeld daaraan gebonden markers. Op een klein drageroppervlak verkregen met een werkwijze volgens de uitvinding kunnen veel verschillende
30 of gelijke elementen dicht bij elkaar te onderscheiden zijn. Dit kan bijvoorbeeld door druppels van 0,25 tot 0,5 nL op het oppervlak aan te brengen. In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt dit aanbrengen uitgevoerd met een printer, in het bijzonder een printer van het
35 inktjet- of bubblejet-type of dergelijke, bij voorkeur piezoelektrisch gestuurde printer. Dergelijke printers zijn

op zichzelf bekend. Toepassing daarvan voor het vervaardigen van (bio)chemische preparaten is bijzonder voordelig doordat een precieze plaatsing en dosering kan worden verkregen met hoge snelheid en reproduceerbaarheid.

5 In een bijzonder voordelige uitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 2.

10 Door althans gedeeltelijk smelten van de kunststof tegen een oppervlak van de dragerbasis kan op bijzonder eenvoudige wijze een optimale verdeling van de kunststof worden verkregen. Bovendien kan daarbij eenvoudig worden uitgegaan van bijvoorbeeld kunststoffolie of plaat. Het is evenwel ook mogelijk bijvoorbeeld polymerisatie van de kunststoflaag op het drageroppervlak te doen plaatsvinden
15 of de kunststof zodanig chemisch te behandelen dat vervloeiing tegen het oppervlak van de dragerbasis optreedt.

20 Zonder aan enige theorie te willen worden gebonden lijkt de bijzondere gladheid van het verkregen drageroppervlak ten minste mede het gevolg te zijn van gebruik van een bijzonder gladde dragerbasis en de afwezigheid van hechting aan de dragerbasis. Een werkwijze volgens onderhavige uitvinding lijkt derhalve te kunnen worden geoptimaliseerd door gebruik van een dragerbasis met een
25 optimale gladheid en afwezigheid van hechting tussen de kunststof en de dragerbasis. Echter, ook bij sub-optimale omstandigheden kunnen reeds voldoende gladde drageroppervlakken worden verkregen.

30 In een eerste voorkeursuitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 3.

35 Toepassing van een kunststof met ten minste één voor het betreffende preparaat actieve groep, biedt het voordeel dat direct de gewenste bindende groepen kunnen worden verkregen. Een groep geschikt voor vorming van aminogroepen gekoppeld aan het drageroppervlak biedt daarbij het

voordeel dat een dergelijke preparaatdrager in het bijzonder geschikt is voor gebruik in de biotechnologie, meer in het bijzonder voor binding van aminozuren.

In een alternatieve uitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 4.

Wanneer de gebruikte kunststof niet direct, althans niet voldoende geschikt is voor binding van het betreffende preparaat, althans daartoe niet met linkers kunnen worden omgevormd, verdient het de voorkeur dat het drageroppervlak zodanig wordt behandeld dat op, althans in het drageroppervlak één of meer actieve groepen voor het betreffende preparaat worden aangebracht, wederom in het bijzonder groepen voor vorming van amino-groepen met behulp van linkers, zoals een -COOH of een -COO-methyl groep. Hiermee wordt het voordeel bereikt dat als kunststof voor het drageroppervlak een materiaal kan worden gebruikt met daarvoor bijzonder geschikte eigenschappen, zoals bijvoorbeeld polyetheen, terwijl de behandeling van het drageroppervlak er daarbij zorg voor draagt dat vorming van de amino-groepen toch bijzonder goed mogelijk wordt. Kunststof heeft daarbij het voordeel, boven bijvoorbeeld mica en glas, dat een dergelijke behandeling bijzonder eenvoudig en goed mogelijk is, waarbij steeds een geschikte behandeling kan worden gekozen, afhankelijk van het te binden preparaat. Met name -COOH groepen maken overigens ook directe of indirecte binding van bijvoorbeeld virussen en dergelijke mogelijk, terwijl ook andere actieve groepen kunnen worden aangebracht, bijvoorbeeld -NH₂ groepen.

In nadere uitwerking wordt een dergelijke werkwijze bij voorkeur gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 5.

Door het drageroppervlak te enten met een kunststof kan een op zichzelf niet of onvoldoende bindend drageroppervlak eenvoudig worden behandeld ten einde de gewenste

activiteit te verkrijgen. Met name het gebruik van acrylic acid of methylacrylaat is daarvoor bijzonder geschikt.

In een verdere voordelige uitvoeringsvorm wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de
5 maatregelen volgens conclusie 6.

Verrassenderwijs is gebleken dat de oppervlakteruwheid van een drageroppervlak in voorkomende gevallen verder kan worden verlaagd door introductie van $-NH_2$ groepen in, althans op het drageroppervlak. Zo kan
10 bijvoorbeeld de oppervlakteruwheid van een met acrylic acid of methylacrylaat behandeld polyetheen daardoor zodanig worden verlaagd dat dit alsnog geschikt, althans beter geschikt kan worden gemaakt voor het gewenste gebruik.

In nadere uitwerking wordt een werkwijze volgens de
15 uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 7, bij voorkeur door de maatregelen volgens conclusie 7 en 8.

Door een oplossing van een geschikte monomeer met het drageroppervlak in contact te brengen en vervolgens de
20 kunststof en oplossing te behandelen, zodanig dat polymerisatie van althans een gedeelte van de monomeer optreedt, kan op bijzonder eenvoudige wijze een dunne zogenaamde hechtlaag, welke goed in staat is de gewenste verbindingen tot stand te brengen, op het drageroppervlak
25 worden aangebracht. Door middel van geschikte bestraling kan deze polymerisatie bijzonder goed tot stand gebracht en gecontroleerd worden.

Als dragerbasis zijn bijzonder geschikt oppervlakken gevormd uit bijvoorbeeld mica of glas of materialen met
30 vergelijkbare oppervlakteruwheid, hardheid en/of poreusiteit. Met name glas blijkt daarvoor bijzonder geschikt.

Tijdens gebruik van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding wordt bij voorkeur in een aantal van
35 elkaar gescheiden, spots te noemen vlekken een vloeistof op het oppervlak gebracht, waarbij elke spot een specifieke

oppervlaktegrootte heeft. Op elke spot kunnen één of meer tests worden uitgevoerd. Door regulering van de dikte van de hechtlaag kan de grootte van elke spot worden bepaald. Verrassenderwijs is gebleken dat bij een relatief dunne

5 hechtlaag met een bepaalde hoeveelheid vloeistof een kleinere spot wordt verkregen dan met eenzelfde hoeveelheid vloeistof bij een dikkere hechtlaag. Zonder aan enige theorie te willen worden gebonden lijkt dit het gevolg te zijn van de zuigende werking van de hechtlaag, althans van

10 vervloeiing van de vloeistof die groter is bij een relatief dikke hechtlaag. Ter illustratie, met een hoeveelheid vloeistof per spotje van ongeveer 0,25 nL kan bij een hechtlaag met een dikte van 1 à enkele atomen een spot worden verkregen met een doorsnede van bijvoorbeeld 0,1 mm

15 of kleiner, terwijl bij een hechtlaag met een aanmerkelijk grotere dikte spots kunnen worden verkregen met een doorsnede van bijvoorbeeld 5 mm of meer. Deze hoeveelheden en afmetingen dienen geenszins als beperkend te worden uitgelegd.

20 In een verdere nadere uitwerking wordt een werkwijze volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 10.

Koppeling van informatiedragende polymeren aan het drageroppervlak biedt het voordeel dat eenvoudig

25 nabehandeling van het oppervlak mogelijk is zonder dat de informatiedragende polymeren daarvan onbedoeld loskomen, zodat deze polymeren na genoemde behandeling eenvoudig kunnen worden onderzocht. Eventueel kunnen voor de koppeling van de polymeren linkers worden gebruikt,

30 waardoor binding kan worden vereenvoudigd, terwijl de selectiviteit verder kan worden verhoogd, teneinde slechts de gewenste bindingen tot stand te laten komen, althans over te houden.

De uitvinding heeft voorts betrekking op een

35 preparaatdrager, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 13.

Juist een preparaatdrager met een drageroppervlak dat uit kunststof is vervaardigd, met een oppervlakteruwheid die zodanig is dat markers van daaraan gehechte biochemische elementen daarop waarneembaar en

5 localiseerbaar zijn, biedt het voordeel dat een dergelijke preparaatdrager bijzonder eenvoudig te vervaardigen en aan te passen is aan de te onderzoeken preparaten, terwijl een dergelijke preparaatdrager op bijzonder eenvoudige wijze kan worden gebruikt, met name ook omdat deze relatief sterk
10 is. Doordat het drageroppervlak geschikt is voor specifieke binding van het preparaat wordt daarbij het voordeel bereikt dat tijdens gebruik niet gebonden elementen van het preparaat eenvoudig kunnen worden gewassen of anderszins worden behandeld, zodat eenvoudig allerlei op zichzelf
15 bekende tests op het preparaat kunnen worden uitgevoerd, zoals ELISA. Juist de specifieke binding van elementen uit het preparaat met specifieke actieve groepen van het drageroppervlak maakt deze tests mogelijk. De bijzondere vlakheid van het drageroppervlak biedt daarbij het voordeel
20 dat een bijzonder hoge informatiedichtheid kan worden verkregen. De te onderzoeken elementen in het preparaat kunnen bijzonder dicht bij elkaar worden geplaatst zonder dat deze niet meer te onderscheiden zijn.

In nadere uitwerking wordt een preparaatdrager
25 volgens de uitvinding voorts gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 17.

-COOH groepen en -COO-methyl groepen in, althans op het oppervlak maken het op eenvoudige wijze mogelijk dat, met behulp van linkers amino-groepen aan het draagoppervlak
30 worden gevormd, welke in het bijzonder geschikt zijn om aminozuren aan te koppelen. Dit biedt het voordeel dat op eenvoudige wijze al dan niet van tevoren gesynthetiseerde, al dan niet complete peptiden, stukjes PNA, stukjes DNA, suikers, andere organische moleculen, eiwitten, virussen,
35 bacteriën en cellen aan het oppervlak kunnen worden gekoppeld, aan de -COOH-groep, de -COO-methyl-groep of de

gevormde amino-groep. Overigens kunnen ook andere actieve groepen worden toegepast. Zo kan bijvoorbeeld broomazijnzuur op het drageroppervlak worden gesynthetiseerd, waaraan vervolgens peptiden kunnen worden gekoppeld via een SH-groep van de betreffende peptiden.

Een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding biedt derhalve het voordeel dat een grote variëteit aan mogelijke chemische bindingen van elementen aan het draagoppervlak kan worden verkregen, waardoor de preparaatdrager nagenoeg universeel toepasbaar is.

De uitvinding heeft voorts betrekking op het gebruik van microscopie en/of fotografie voor biochemisch onderzoek, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 19.

Juist gebruik van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding in samenwerking met een microscoop of een foto-inrichting is voordelig daar de bijzondere vlakheid van het drageroppervlak van de preparaatdrager er voor zorgdraagt dat steeds goed kan worden scherp gesteld, zodat bijzonder kleine kleurvlakken of andersoortige markers op eenvoudige wijze detecteerbaar en van elkaar te onderscheiden zijn. Anders dan bij de bekende werkwijze kan derhalve op een relatief klein oppervlak een bijzonder groot aantal markers worden onderscheiden, bij voorkeur wordt daarbij een confocale microscoop scanner of dergelijke microscoop toegepast.

De uitvinding heeft verder betrekking op het gebruik van een printer voor het op een preparaatdrager volgens de uitvinding aanbrengen van te onderzoeken preparaat, gekenmerkt door de maatregelen volgens conclusie 20.

Printers, in het bijzonder een printer van het inktjet-type, bubblejet-type of vergelijkbare printers die werken met een "drop-on-demand" techniek zoals bijvoorbeeld een printer met een glazen capillair waaruit druppelsgewijs vloeistof wordt verspoten in zeer kleine "druppels" onder invloed van een vervorming van de wand met behulp van een

piezoelektrisch element, bieden het voordeel dat hiermee relatief snel en met hoge nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid kleine tot bijzonder kleine hoeveelheden enigszins vloeibaar preparaat op een drageroppervlak kunnen worden gebracht, op bijzonder dicht bij elkaar gelegen onderscheiden posities. Eventueel kunnen daarmee ook conjugaten worden toegevoegd. Hierdoor kunnen op eenvoudige en snelle wijze preparaatdragers gereed worden gemaakt voor onderzoek, waarbij bijzonder veel informatie op relatief kleine preparaatdragers kan worden aangebracht. Dit maakt behandeling en analyse van de informatie op de preparaatdragers bijzonder eenvoudig mogelijk.

Verdere nadere uitvoeringsvoorbeelden van werkwijzen en preparaatdragers volgens de uitvinding zijn gegeven in de verdere volgconclusies.

Ter verduidelijking zullen uitvoeringsvoorbeelden van een werkwijze en een preparaatdrager hieronder nader worden toegelicht aan de hand van de tekening. Daarin toont:

fig. 1 een dragerbasis;

fig. 2 een dragerbasis met een daarop aangebrachte kunststoflaag;

fig. 3 de kunststoflaag, losgenomen van de dragerbasis;

fig. 3a een kunststoflaag volgens fig. 3, in een alternatieve kunststof.

fig. 4 de kunststoflaag met op het drageroppervlak geënte hechtlaag;

fig. 5 schematisch een weergave van een preparaatdrager met aan het drageroppervlak gehechte peptiden;

fig. 6 in sterke uitvergroting het oppervlak van respectievelijk het oppervlak van een gebruikelijk toegepaste pen, het oppervlak van mica, het oppervlak van

een drageroppervlak volgens onderhavige uitvinding,
vervaardigd uit polyetheen en het oppervlak van glas;

fig. 7 een viertal oppervlakken volgens onderhavige
uitvinding, waarbij het drageroppervlak is geënt met een

5 laag methyacrylaat;

fig. 8 een viertal oppervlakken van een
drageroppervlak volgens onderhavige uitvinding, geënt met
polyacrylaat; en

fig. 9 schematische weergave van een pepscan op een
10 drageroppervlak.

. In deze beschrijving hebben gelijke of
corresponderende delen gelijke of corresponderende
verwijzingscijfers. Voorts wordt als voorbeeld in deze
beschrijving, mits niet anders aangegeven, uitgegaan van
15 een preparaatdrager geschikt voor het op een
drageroppervlak daarvan vormen van amino-groepen,
vervaardigd uit behandeld, tegen glas gesmolten polyetheen
of polypropreen. Het zal evenwel duidelijk zijn dat ook
andere kunststoffen en een andere dragerbasis kunnen worden
20 toegepast, bijvoorbeeld een dragerbasis van mica en een
polycarbonaat, acrylic acid of methyacrylaat als kunststof
voor de eigenlijke preparaatdrager. Met name de laatst-
genoemde kunststoffen kunnen daarbij het voordeel bieden
dat daarop direct -COOH- of -COO-methyl groepen beschikbaar
25 zijn. Polyetheen en polypropyleen zijn relatief inert. Zij
bieden daarbij echter het voordeel dat zij relatief hard en
sterk zijn, zonder dat zij bros zijn. Bovendien kunnen
hierop eenvoudig andere kunststoffen worden geënt.

In deze beschrijving zal steeds een relatieve
30 vlakheidsmaat worden aangehouden, waarbij de maximale
hoogte (Z-as) van uitsteeksels boven een nominaal
referentievlak wordt gegeven als percentage van één der
horizontale maten (X-as) van het gescande oppervlak. Deze
horizontale maat is in deze beschrijving in de orde van
35 grootte van 2000-4500 nanometer. De maat voor vlakheid V
wordt derhalve uitgedrukt in de volgende formule:

$$\frac{Z-as}{X-as} \times 100\%$$

Voorbeelden van de vlakheid V van materialen:

- 5 - mica: V = 0,1% (fig. 6b);
- glas: V = 0,3% (fig. 6d);
- hoog moleculair polyetheen: V = 10% (fig. 6a);
- polyetheenfolie; V = 3% (fig. 6b); en
- een polyetheenvlak gevormd volgens de uitvinding,
- 10 V = 0.6% (fig. 6c);
- polyetheen pin oppervlak: V \cong 28%.

Deze afmetingen en waarden zijn slechts gegeven als
voorbeeld en dienen geenszins als beperkend te worden
15 uitgelegd.

Legenda: In de tekening geldt:

□ = -COOH of -COO-methyl

○ = -NH₂

└ = antilichaam

20 ⚡ = peptide

◐ = marker

Fig. 1 toont in doorgesneden zij aanzicht een
dragerbasis 2, gevormd uit mica, met een bovenoppervlak 4
25 met een vlakheid V van ongeveer 0,1%. Dit betekent derhalve
dat zich op het vlak 4 oneffenheden bevinden met een
maximale hoogte in de Z-richting gemeten boven het nominale
vlak N van ten hoogste enkele nanometers, bijvoorbeeld
4 à 5 nanometer. Het oppervlak 4 van mica is derhalve
30 bijzonder vlak. Het oppervlak 4 is bijvoorbeeld rechthoekig
met buitenafmetingen van 25 x 25 millimeter. De basisdrager
2 heeft een dikte van bijvoorbeeld 0,5 millimeter.

In de in fig. 2 getoonde toestand is op het gladde
bovenoppervlak 4 van de basisdrager 2 een kunststoflaag 6
35 aangebracht. In de getoonde uitvoeringsvorm is dit een
polyetheenfolie met een eigen vlakheid van ongeveer 3%. De

folielaag heeft een dikte van bijvoorbeeld 0,035 millimeter.

De folielaag 6 en/of de basisdrager 2 worden zodanig verwarmd dat ten minste de naar het oppervlak 4 gekeerde zijde van de kunststoflaag 6 smelt en op het oppervlak 4 vervloeit, waarna het geheel wordt afgekoeld. Tussen de glas-basisdrager en de kunststoflaag 6 zal geen hechting van enige betekenis optreden, waardoor de kunststoflaag 6 eenvoudig weer van de basisdrager 2 kan worden afgenomen.

10 Verrassenderwijs is gebleken dat het oppervlak 8 van de kunststoflaag 6 dat naar de basisdrager 2 gekeerd was een vlakheid V heeft gekregen die aanmerkelijk beter is dan de vlakheid V van de gebruikte polyetheenfolie. De vlakheid van het drageroppervlak 8 is bijvoorbeeld ongeveer 0,6%

15 wanneer geen verder speciale maatregelen zijn genomen. Overigens wordt opgemerkt dat vervloeiing van ten minste het naar de basisdrager 2 gekeerde deel van de kunststoflaag 6 in voorkomende gevallen ook, althans mede kan worden verkregen door bijvoorbeeld een chemische

20 reactie.

Fig. 3 toont een preparaatdrager 1 gevormd volgens onderhavige uitvinding, waarbij het drageroppervlak 8 naar boven is gekeerd. In deze getoonde uitvoeringsvorm is als kunststof bijvoorbeeld polyetheen of polypropeen gebruikt,

25 dat relatief inert is. Binding hieraan van biochemische elementen is daardoor feitelijk niet mogelijk. In fig. 3A is een alternatieve uitvoeringsvorm getoond, waarbij als kunststoflaag 106 een kunststof is toegepast met daarin actieve groepen 112, symbolisch weergegeven door op stokjes

30 geplaatste bolletjes. Een dergelijke kunststof kan bijvoorbeeld een polycarbonaat, een acrylic acid of methyl acrylaat zijn, waarin bijvoorbeeld als actieve groepen 112 -COOH of -COO-methyl groepen aanwezig zijn, in de tekening symbolisch weergegeven met respectievelijk een vierkantje

35 en een bolletje op een stokje.

In fig. 4 is een preparaatdrager 1 getoond met daarop geënt een kunststoflaag 10, bijvoorbeeld een gepolymeriseerde laag acrylic acid of methylacrylaat. Een dergelijke laag 10 kan als volgt op de kunststofdragerlaag 5 6 van polyetheen of andere kunststof worden aangebracht.

Het kunststofdeel 6 met het gladde drageroppervlak 8 wordt ondergedompeld in een oplossing van een monomeer met een specifieke concentratie, waarna de oplossing met de daarin opgenomen kunststof wordt bestraald met radioactieve 10 straling van een specifieke intensiteit, zodanig dat ten minste op het drageroppervlak 8 polymerisatie van de betreffende monomeer optreedt.

Geschikte monomeeroplossingen zijn bijvoorbeeld een 0,6% of 6% acrylic acid (AC) monomeeroplossing of een 0,6% 15 of 6% methylacrylaat (MA) monomeeroplossing. Deze kunnen bijvoorbeeld bestraald worden met γ -straling van bijvoorbeeld 2 of 12 kilo Gray (kGy). Door een geschikte keuze van de bestralingsduur wordt daarmee een gewenste dikte van de betreffende gepolymeriseerde laag op en 20 gedeeltelijk in het drageroppervlak 8 verkregen. Een dergelijke hechtlaag is bijvoorbeeld enkele moleculen of ketens dik, zodat de vlakheid van het drageroppervlak 8 zoveel mogelijk wordt behouden of zelfs nog wordt vergroot.

In fig. 7 en 8 is een achttal preparaatdragers 25 volgens figuur 4 weergegeven, geënt in oplossingen respectievelijk van monomeren methylacrylaat (fig. 7) of acrylic acid (fig. 8) met verschillende concentraties en verschillende bestralingshoeveelheden. Zoals blijkt uit fig. 7 zijn met name de in de figuren 7c, 7d en 7h 30 weergegeven oppervlakken bijzonder vlak en derhalve uitermate geschikt voor preparaatonderzoek. De codering geeft achtereenvolgens de dragerkunststof (PE), de concentratie van de oplossing (in %), de hoeveelheid bestraling (in kilo Gray) en de gebruikte ent-kunststof (AC 35 of MA). Uiteraard zijn ook andere combinaties mogelijk, bijvoorbeeld meer of minder of andere monomeren, andere

belichtingshoeveelheden, andere polymerisatiemethoden en andere dragerkunststoffen. Geschikte keuzen daaruit zijn voor de vakman direct duidelijk en zonder verdere uitvinding te bepalen.

5 Een volgens de uitvinding vervaardigde preparaatdrager kan als volgt worden toegepast.

Met behulp van EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide) wordt het peptide AC-SDSSFFSYGEIPFGK op het drageroppervlak aangebracht, gekoppeld met een
 10 actieve groep 12. Vervolgens wordt hierop een ELISA uitgevoerd met een monoklonaal antibody (mAb) 59.7 (1/10.000) voor en na onderbreking in een onderbrekingsbuffer. Hiertoe wordt het draagoppervlak ultrasoon schoongemaakt bij 70° in aanwezigheid van
 15 sodiumdedocylsulfaat (SDS) en beta-mercaptoethanol (BME). De resultaten van deze ELISA zijn gegeven in tabel 1. Duidelijk blijkt dat op de met kunststof (acrylic acid) geënte drageroppervlak het peptide is gekoppeld, aangezien na onderbreken nog steeds binding van het monoklonaal
 20 antibody mogelijk is, terwijl dit na onderbreken bij het kale drageroppervlak 8 niet meer mogelijk is. Gebleken is dat speciaal de geënte kunststoffen (0,6/12Ac) en (0,6/2Ac) bijzonder goede resultaten geven.

Van te voren gesynthetiseerde complete peptiden,
 25 zowel als stukjes PNA, stukjes DNA, suikers of volledige gecompliceerde organische moleculen, eiwitten, virussen, bacteriën en cellen kunnen aan een drageroppervlak van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden gekoppeld. Deze kunnen in principe zowel aan de op het
 30 drageroppervlak door linkers met de -COOH- of -COO-methyl groepen gevormde amino groepen worden gekoppeld. Ook kan bijvoorbeeld broomazijnzuur aan een NH₂ groep worden gekoppeld voor verkrijging van een broom-groep. Aan deze broom-groep kan een peptide via een SH-groep daar van
 35 worden gekoppeld. Dit kan prijstechnisch voordelig zijn. Een aldus gevormde en behandelde preparaatdrager kan worden

bekeken met bijvoorbeeld een confocale microscoop scanner. Hiermee kan een goed beeld worden verkregen van een relatief groot oppervlak vergeleken met bijvoorbeeld digitaal opgeslagen vergelijkingsmateriaal.

5 Bij een andere toepassing van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden virussen of antilichamen direct of via linkers met actieve groepen 12 op, althans in het drageroppervlak 8 gebonden.


De te binden virussen of antilichamen hebben of
 10 worden voorzien van actieve groepen, bijvoorbeeld -COOH groepen en/of -NH₂ groepen, welke direct of via linkers kunnen worden gekoppeld aan de actieve groepen 12 op, althans in het drageroppervlak 8, 10. Zo kunnen bijvoorbeeld -NH₂ groepen van een virus worden gekoppeld
 15 aan een -COOH groep of een -NH₂ groep van het drageroppervlak 8, 10, terwijl -COOH groepen van een virus bijvoorbeeld kunnen worden gekoppeld aan -NH₂ groepen van het drageroppervlak 8, 10. Als linkers kunnen verschillende chemicaliën worden toegepast, bijvoorbeeld HMDA
 20 (Hexamethyleendiamine) of EDA (Ethyleendiamine). Daarmee kunnen bijvoorbeeld -NH₂ groepen als actieve groepen worden geïntroduceerd in of op een drageroppervlak 8, 10 dat slechts of in hoofdzaak bijvoorbeeld -COOH groepen als actieve groepen 12 omvat. HMDA kan worden gebruikt door
 25 koppeling van Boc HMDA (Butyloxycarbonylhexamethyleendiamine) via DCC (Dicyclohexylcarbodiimine) aan de -COOH groepen, waardoor na Boc-deprotectie -NH₂ groepen beschikbaar komen voor koppeling van antigen. Bij gebruik van EDA kan aan met methylacrylaat behandeld oppervlak 8,
 30 10 een behandeling volgen van bijvoorbeeld 72 uur bij 40°C met genoemd EDA, waarbij actieve -NH₂ groepen beschikbaar komen. De eerste drageroppervlakken zijn bijvoorbeeld PE (0,6/2 Ac) Hmda en PE(0,6/12Ac)-Hmda, terwijl het tweede type oppervlak bijvoorbeeld voldoet aan PE(0,6/2 MA)-EDA.

35 De overige in fig. 7 en 8 getoonde oppervlakken zijn minder vlak. Introductie van -NH₂ groepen in deze

oppervlakken, bijvoorbeeld op de hiervoor beschreven wijze, leidt verrassenderwijze tot een verbetering van de vlakheid V van deze oppervlakken. Dit betekent dat deze oppervlakken door introductie van genoemde $-NH_2$ groepen daarin ook, althans nog beter geschikt worden voor gebruik als preparaatdrager voor ten minste vormgericht onderzoek.

Een verder onderzoek met een preparaatdrager wordt hieronder globaal beschreven, als voorbeeld en dient geenszins als beperkend te worden opgevat.

Fig. 9 toont schematisch een weergave van een pepsan-onderzoek, omvattende de primaire aminozuur sequentie van GP120 van HIV1, het hoofdglycoproteïne van HIV-1. Elke cirkel verbeeldt een aminozuur. Voor de aminozuren is de 1-lettercode gebruikt (A=alanine, C=cysteine, D=aspartic acid, E=glutamic acid, F=phenyialanine, G=glycine, H=histidine, I=isoleucinem, K=lysine, L=leucine, M=methionine, N=asparagine, P=proline, Q=glutamine, R=arginine, S-Serine, T=trreonine, V=valine, W=tryptophan, y=tyrosine).

De aminozuursequentie van GP120 van HIV-1 wordt verdeeld in overlappende peptiden als aangegeven. Peptide nummer 1 is de peptide die start met aminozuur nummer 1 en eindigt met aminozuur nummer 9, peptide nummer 2 is de peptide die start aminozuur nummer 2 en loopt tot aminozuur nummer 10, enz. De peptiden worden gesynthetiseerd op het drageroppervlak, zoals getoond onder in fig. 9. De peptiden zijn aangegeven met individuele driehoekjes. Vervolgens wordt het volledige drageroppervlak in contact gebracht met hetzelfde antilichaam, weergegeven door . Sommige peptiden zullen binden aan dit antilichaam. Nadat de oplossing van antilichaam van het drageroppervlak is gespoeld kan de nog op het drageroppervlak aanwezige antilichaam, dat is gebonden door de peptiden, worden aangetoond met behulp van anti-antilichaamconjugaat. Hierdoor wordt direct de sequentie van de peptide die heeft gebonden aan het antilichaam bepaald. Markers kunnen zijn aangebracht, bij

voorkeur fluorescentiemarkers doch ook andere markers kunnen worden toegepast, bijvoorbeeld radioactieve markers, edelmetaal zoals goud, kleurmarkers en dergelijke. Zoals blijkt uit fig. 9 zijn de individuele peptiden bijzonder
5 dicht bij elkaar geplaatst. Doordat het drageroppervlak bijzonder vlak is kunnen deze, althans de daaraan gehechte markers toch individueel worden waargenomen met een confocale microscoop scanner. Dit betekent bovendien dat slechts bijzonder weinig van de verschillende bij de test
10 benodigde elementen noodzakelijk is, zoals de te onderscheiden peptiden, conjugaat, antilichaam, anti-antilichaamconjugaat en dergelijke.

Nadat de gewenste sequentie van de of elke betreffende peptide is vastgesteld kan het antilichaam
15 worden verwijderd van de peptiden en kunnen de peptiden worden hergebruikt. Door gebruik te maken van een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding kunnen bijzonder veel verschillende peptide worden gesynthetiseerd in relatief korte tijd.

20 Het verdient de voorkeur dat de peptiden met behulp van een inktjetprinter of een bubblejetprinter of dergelijke op "drop-on-demand" techniek gebaseerde printers op het drageroppervlak worden aangebracht, doordat hierdoor eenvoudig, snel en met grote nauwkeurigheid en
25 reproduceerbaarheid een bijzonder dichte pakking van de betreffende peptiden op het drageroppervlak kan worden aangebracht. Bijvoorbeeld kunnen 'druppels' van 0,25 tot 0,5 nanoliter met 1 tot 2 kilohertz worden verspoten. De dragerkunststof heeft daarbij het voordeel dat dit goed
30 bestand is tegen de peptide-chemie, welke te agressief lijkt wanneer glas als drager zou worden gebruikt. Met een werkwijze volgens onderhavige uitvinding kan een zeer vergaande microturisatie van de pepscan worden verkregen. Voor het scannen van het oppervlak met daaraan gebonden
35 peptiden en dergelijke wordt bij voorkeur een confocale microscoop toegepast. Juist bij een dergelijke microscoop

heeft de bijzondere gladheid van het oppervlak grote voordelen.

In tabel 2 is voor de acht in fig. 7 en 8 getoonde oppervlakken weergegeven ELISA-waarden van monoklonale
5 antilodies en hun bijbehorende peptiden, gesynthetiseerd op de betreffende drageroppervlakken. Hieruit blijkt dat synthesisering op alle gebruikte geënte oppervlakken mogelijk is, ongeacht de dikte daarvan. Zo kunnen peptiden, DNA, PNA en dergelijke informatiedragende polymeren daarop
10 worden gesynthetiseerd.

Een preparaatdrager volgens de onderhavige uitvinding biedt als belangrijk voordeel ten opzichte van de stand van de techniek dat op bijzonder eenvoudige wijze verschillende soorten actieve groepen aan, althans in het
15 drageroppervlak kunnen worden aangebracht, zoals de genoemde -COOH groepen en -NH₂ groepen. Al naar gelang de gewenste toepassing en de gewenste bindingen kan het drageroppervlak, indien nodig, op geschikte wijze worden behandeld. Bovendien kunnen de actieve groepen bijzonder
20 dicht op elkaar worden aangebracht, zodat een hoge dichtheid van de te detecteren elementen uit het preparaat kan worden verkregen, bijvoorbeeld 999 peptiden per cm². Daardoor kan het oplossend vermogen van de gebruikte detectietechniek aanmerkelijk worden vergroot, althans op
25 meer optimale wijze benut.

De vlakheid van het drageroppervlak 8 kan eventueel nog verder worden vergroot door gebruik te maken van daartoe geëigende technieken, bijvoorbeeld vacuümtechnieken bij het op de dragerbasis 2 plaatsen en smelten, althans
30 doen vervloeien van de kunststoflaag 6. Hierdoor wordt verhinderd dat gasinsluitels tot oneffenheden kunnen leiden.

De uitvinding is geenszins beperkt tot de in de tekening en de beschrijving getoonde
35 uitvoeringsvoorbeelden. Vele variaties daarop zijn binnen

het door de bijgevoegde conclusies geschetste raam van de uitvinding mogelijk.

5 Zo kunnen andere kunststoffen worden toegepast voor vorming van het drageroppervlak en/of voor het enten daarop van de laag 10. Geschikte kunststoffen kunnen bijvoorbeeld worden gekozen op basis van de gewenste actieve groepen, de gewenste hardheid of flexibiliteit, de gewenste combinatie van dragerkunststof en ent-kunststof, eventuele bestandheid tegen bijvoorbeeld chemicaliën, bestraling, belichting en
10 dergelijke. Dergelijke keuzen zullen voor de vakman binnen het raam van de uitvinding direct duidelijk zijn.

Voorts kunnen preparaatdragers volgens onderhavige uitvinding ook voor andere onderzoeken worden toegepast, bijvoorbeeld waarbij gebruik wordt gemaakt van markers voor
15 het vaststellen van de aanwezigheid van bepaalde elementen, bijvoorbeeld fluorescerende, kleurende of stralende markers. In de getoonde uitvoeringsvoorbeelden is de kunststoflaag steeds op de basisdrager aangebracht, doch het is uiteraard ook mogelijk een kunststoflaag te bewerken
20 met een voldoende glad oppervlak van een basisdrager die tegen of langs het oppervlak van de kunststoflaag wordt bewogen, bijvoorbeeld een basisdrager van mica of glas. Het is eveneens mogelijk polymerisatie van een kunststof te doen plaatsvinden op een basisdrager met de gewenste
25 gladheid of op andere wijze vorming van kunststof daarop met geschikte eigenschappen te verkrijgen. Uiteraard kunnen allerlei verschillende preparaten op een preparaatdrager volgens onderhavige uitvinding worden gebonden. De beschreven virussen dienen slechts als voorbeeld.

30 Deze en vele vergelijkbare variaties worden geacht binnen het door de conclusies geschetste raam van de uitvinding te vallen.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het vervaardigen van een preparaatdrager, in het bijzonder geschikt voor gebruik bij chemisch en biochemisch onderzoek, waarbij:
 - op ten minste één oppervlak van een dragerbasis een
5 laag kunststof wordt aangebracht,
 - waarbij de kunststoflaag thermisch en/of chemisch wordt behandeld, zodanig dat de oppervlakteruwheid van de naar de dragerbasis gekeerde zijde van de kunststof wordt verlaagd, terwijl deze niet aan de dragerbasis hecht,
 - 10 - waarna de kunststof van de dragerbasis wordt afgenomen, waarbij het vrijkomende, relatief gladde oppervlak van de kunststof een drageroppervlak vormt.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij het kunststof door althans gedeeltelijk smelten over het ten minste ene
15 betreffende vlak van de dragerbasis wordt aangebracht.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij als kunststof een mono- of polymeer wordt toegepast met ten minste één voor het betreffende preparaat actieve groep, in het bijzonder een groep die kan worden gebruikt voor de
20 vorming van een amino-groep zoals een -COOH of een -COO-methyl groep.
4. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij het drageroppervlak wordt behandeld, zodanig dat het drageroppervlak van ten minste één voor het betreffende preparaat
25 actieve groep omvat, in het bijzonder een groep die kan worden gebruikt voor de vorming van een amino-groep zoals een -COOH of een -COOH methyl groep.
5. Werkwijze volgens conclusie 4, waarbij het drageroppervlak wordt geënt met een kunststof, in het
30 bijzonder met behulp van een mono- of polymeer, bij voorkeur acrylic acid of methyl acrylaat.
6. Werkwijze volgens één der conclusies 4 of 5, waarbij door introductie van -NH₂ groepen in, althans op het

drageroppervlak de oppervlakteruwheid daarvan wordt verlaagd.

7. Werkwijze volgens één der conclusies 4 - 6, waarbij ten minste de kunststoflaag op ten minste het
5 drageroppervlak in contact wordt gebracht met een oplossing van een monomeer, waarna de kunststof en de oplossing zodanig worden behandeld dat polymerisatie van althans een gedeelte van de monomeer optreedt op het drageroppervlak, waartoe bij voorkeur de kunststof tezamen met de oplossing
10 wordt blootgesteld aan straling.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij het drageroppervlak wordt voorzien van een gepolymeriseerde hechtlaag met een relatief geringe dikte, bij voorkeur een dikte van ten hoogste enkele atomen of relatief vlakke
15 ketens.
9. Werkwijze volgens één der conclusies 3 - 8, waarbij de actieve groepen met behulp van linkers worden omgezet in aminogroepen.
10. Werkwijze volgens één der conclusies 3 - 9, waarbij
20 aan ten minste een aantal actieve groepen, eventueel onder tussenkomst van geschikte linkers, informatiedragende polymeren worden gekoppeld of worden gesynthetiseerd.
11. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, waarbij een dragerbasis wordt toegepast met een bijzonder
25 lage oppervlakteruwheid van ten minste het vlak waarop de kunststof wordt aangebracht, bij voorkeur met een oppervlakteruwheid die in de orde van grootte van atomaire ruwheid ligt of enigszins daarboven.
12. Werkwijze volgens conclusie 11, waarbij een basis-
30 drager wordt toegepast waarvan althans het genoemde vlak is vervaardigd uit mica of glas of een qua oppervlakteruwheid, hardheid en poreusiteit vergelijkbaar materiaal, bij voorkeur uit glas.
13. Preparaatdrager voor gebruik bij onderzoek van een
35 preparaat, in het bijzonder een biochemisch preparaat, welke preparaatdrager een drageroppervlak heeft dat van

kunststof is vervaardigd, waarbij het drageroppervlak een oppervlakteruwheid heeft die zodanig is dat markers van daaraan gehechte biochemische elementen daarop waarneembaar en localiseerbaar zijn, waarbij het drageroppervlak
5 geschikt is voor het althans covalent binden van het preparaat.

14. Preparaatdrager volgens conclusie 13, waarbij het drageroppervlak is gevormd door de kunststof althans gedeeltelijk te smelten op een dragerbasis met een
10 oppervlakteruwheid die kleiner is dan of ongeveer gelijk is aan de oppervlakteruwheid van het drageroppervlak.

15. Preparaatdrager volgens conclusie 13 of 14, waarbij de kunststof een polymeer is, in het bijzonder polyetheen of polypropreen.

15 16. Preparaatdrager volgens één der conclusie 13 - 15, waarbij het drageroppervlak is geënt met behulp van een mono- of polymeer, bij voorkeur acrylic acid of methyl-acrylaat.

20 17. Preparaatdrager volgens één der conclusie 13 - 16, waarbij het drageroppervlak ten minste -COOH of -COO-methyl groepen omvat.

18. Preparaatdrager volgens één der conclusies 13-17, waarbij het drageroppervlak een relatief grote dichtheid aan en bij voorkeur een relatief regelmatige verdeling van
25 actieve groepen heeft.

19. Gebruik van microscopie en/of fotografie voor biochemisch onderzoek, waarbij een preparaatdrager wordt voorzien van een kunststof drageroppervlak, bij voorkeur volgens één der conclusies 13 - 18, waarbij peptiden of
30 organische moleculen of gedeelten daarvan of dergelijke elementen aan het drageroppervlak worden gebonden, waarbij ten minste de gebonden elementen worden voorzien van markers, waarbij de aanwezigheid en de positie van de markers na behandeling van de preparaatdrager met behulp
35 van een microscoop en/of fotografische inrichting worden vastgesteld.

20. Gebruik van een printer voor het op een
preparaatdrager volgens één der conclusies 13-18 brengen
van te onderzoeken preparaat of daarbij te gebruiken
vloeistof, oplossing en/of conjugaat, in het bijzonder een
5 printer van het inktjet- of bubblejet-type of een
dergelijke op "drop-on-demand" techniek gebaseerde printer.

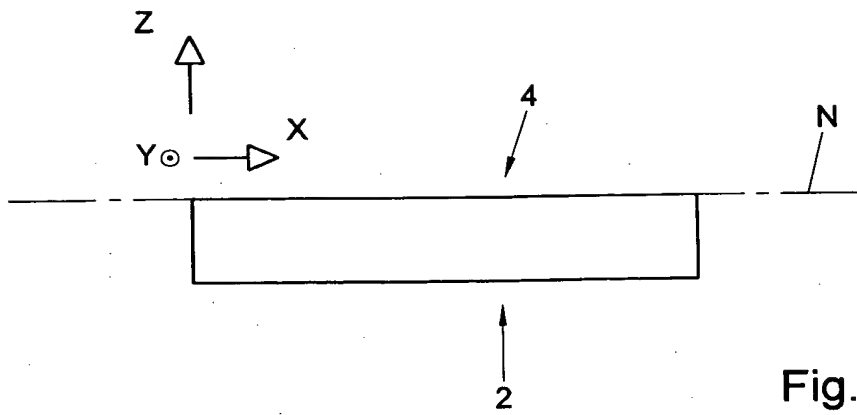


Fig. 1

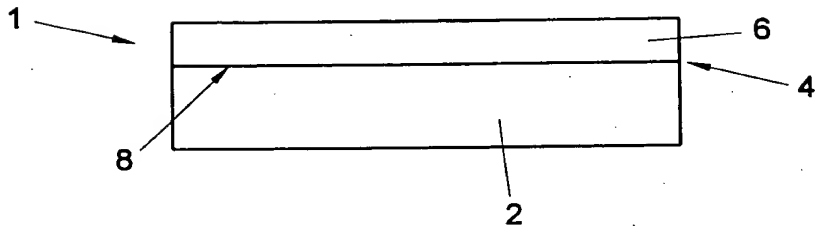


Fig. 2

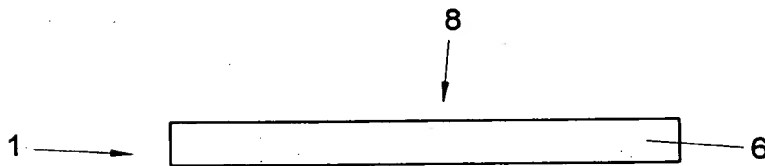


Fig. 3

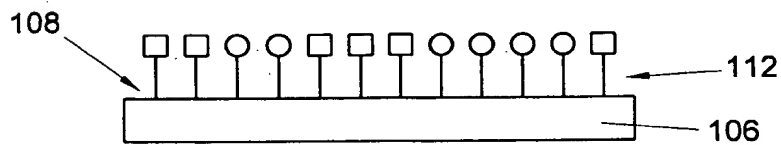


Fig. 3A

6/11/01

1009703

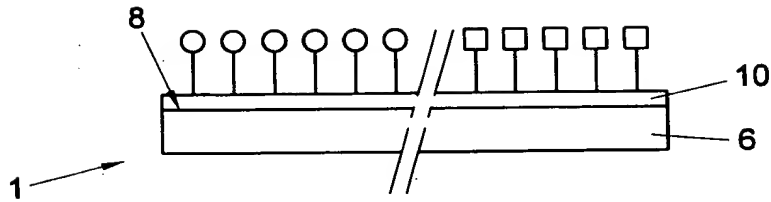


Fig. 4

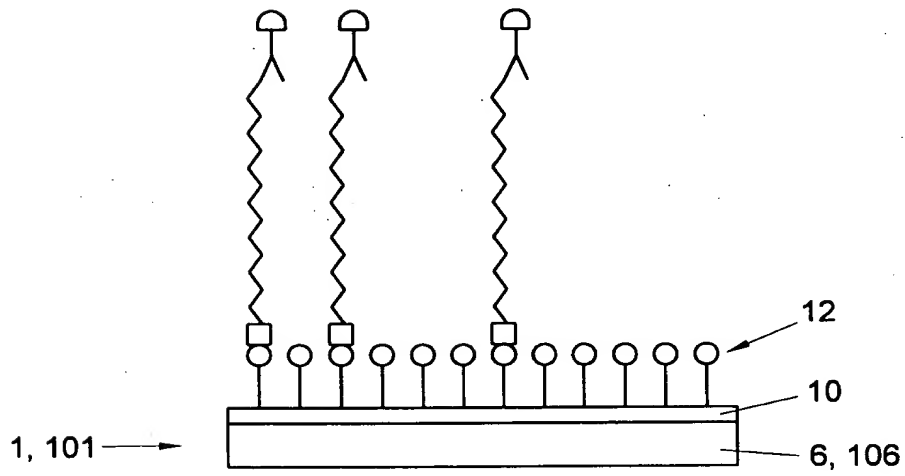


Fig. 5

4f 6

BEST AVAILABLE COPY

1009703

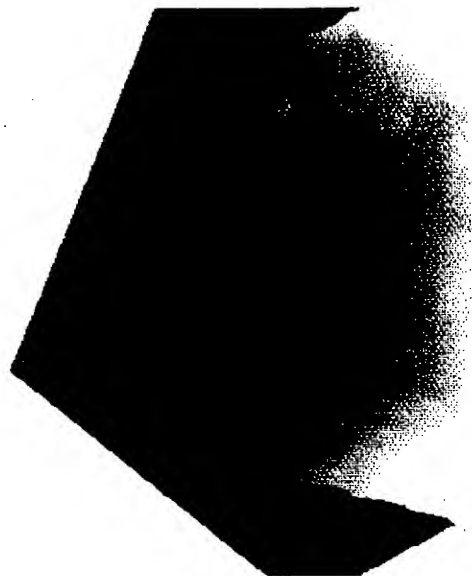
1D-R496

2500.0 nm

Y-axis

2500.0 nm

X-axis



A

708 nm Z-axis

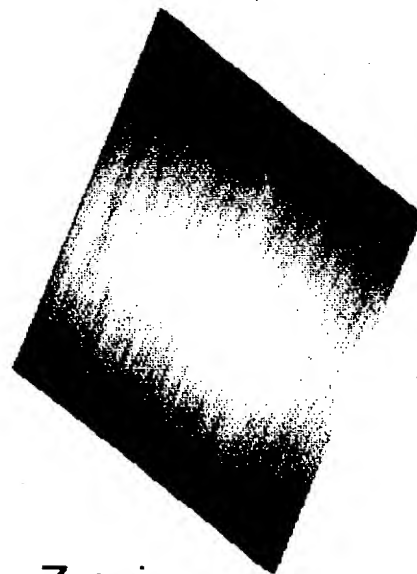
1DDL0209

2675.7 nm

Y-axis

2675.7 nm

X-axis



B

13.2 nm Z-axis

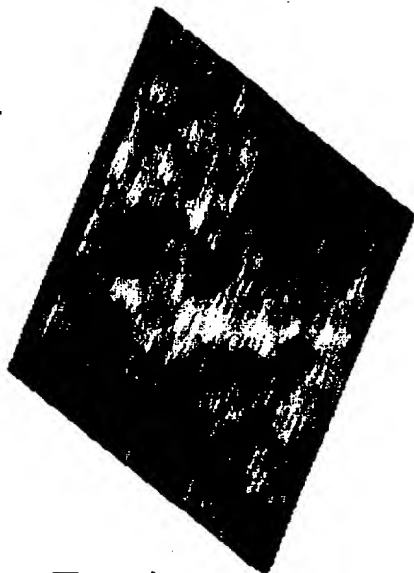
1DDL0084

4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm

X-axis



C

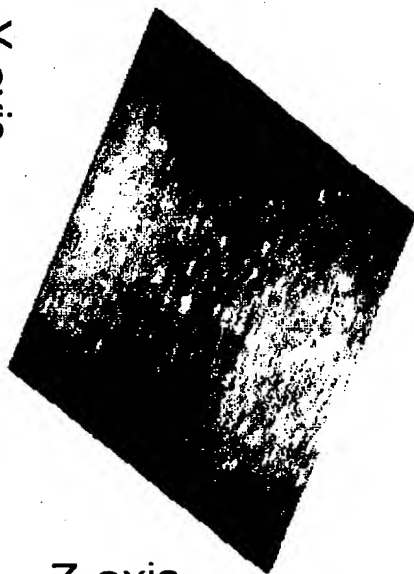
28.0 nm Z-axis

2000.0 nm

Y-axis

2000.0 nm

X-axis



D

6.22 nm Z-axis

Fig. 6

Handwritten signature

1009703

BEST AVAILABLE COPY

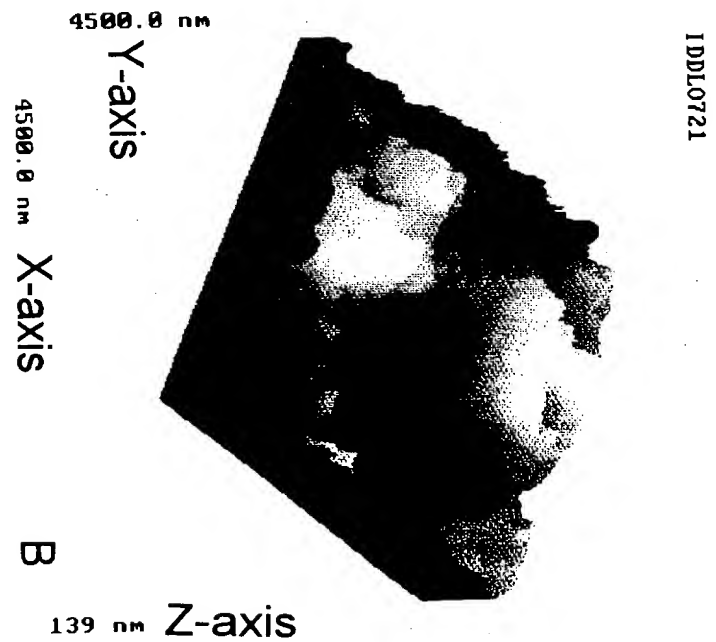
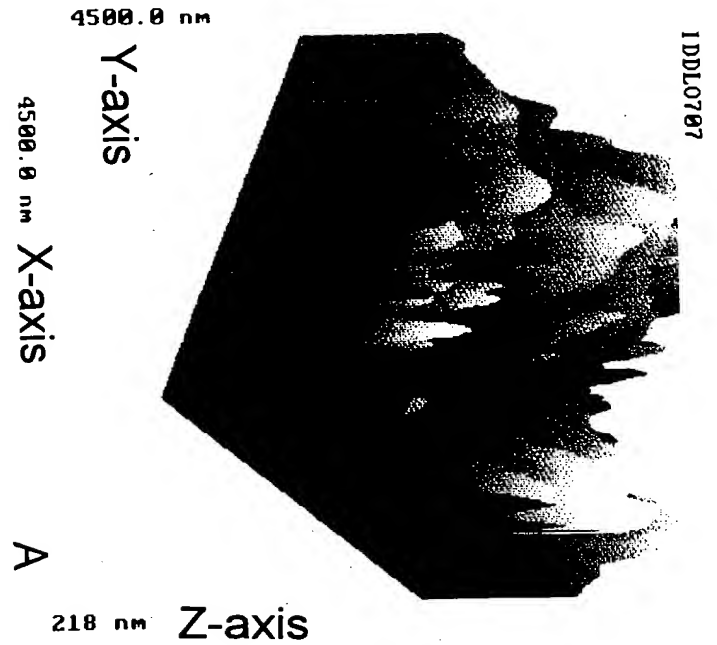
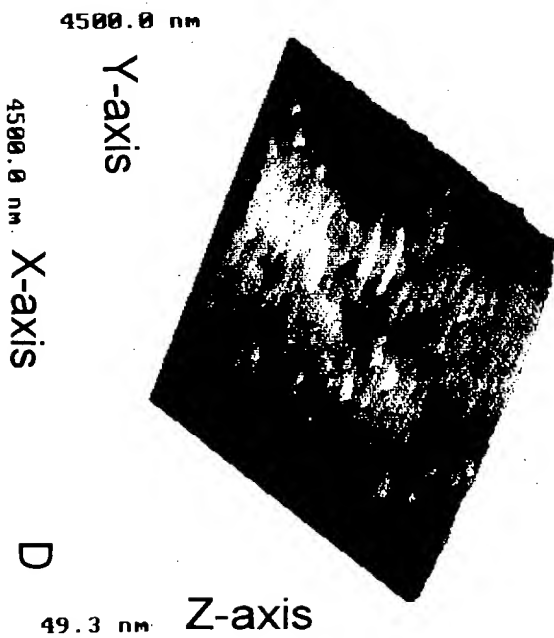
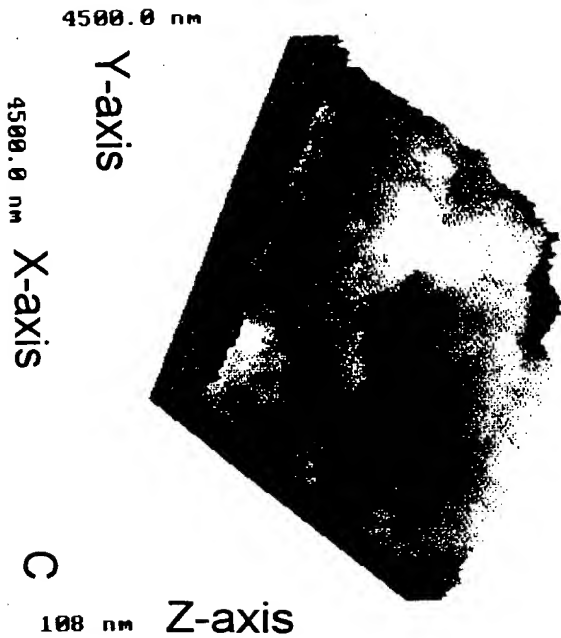


Fig. 7

1009703

BEST AVAILABLE COPY

1DDL0348

4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

1DDL0363

A

123 nm Z-axis

Y-axis

4500.0 nm X-axis

1DDL0689

B

70.7 nm Z-axis

1DDL0359

4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

C

29.7 nm Z-axis

4500.0 nm

Y-axis

4500.0 nm X-axis

D

46.5 nm Z-axis

Fig. 8

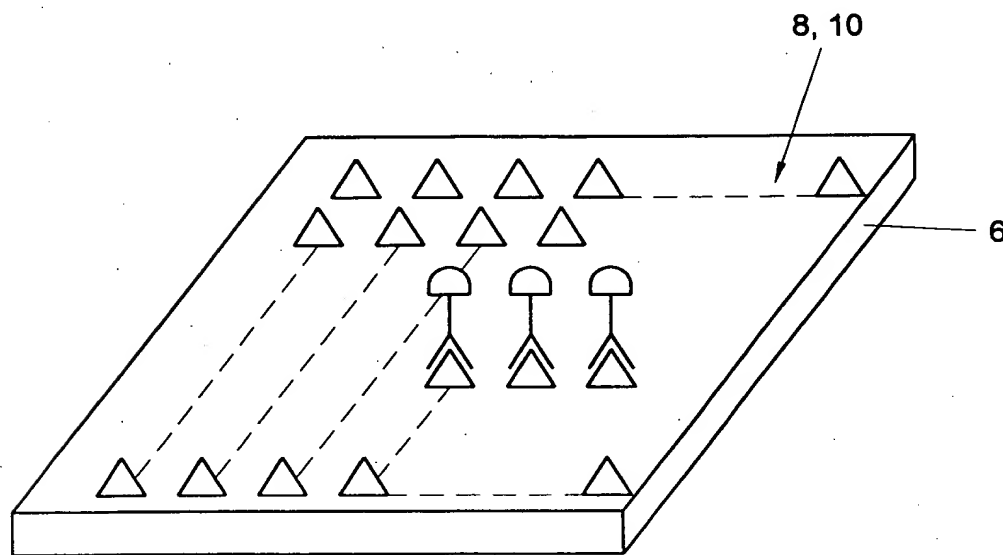
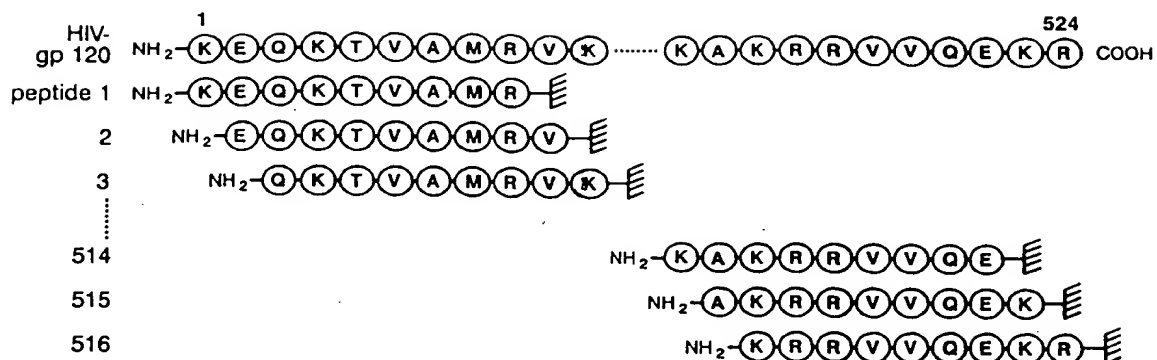


Fig. 9

1009703

Tabel 1:

OD405	Oppervlak alleen vlak gemaakt basispolymeer		Vlak 0.6/2AC		Vlak 0.6/12AC	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
	3231	192	3502	1517	3127	2754

Tabel 2:

OD405

graftsoort dragerpolymeer	peptide AcGQPAVRNE MAB 3C8 1/2000000	peptide AcSFFSYGEI MAB 57.9 1/750000
6/12MA	950	590
6/2 MA	857	681
0.6/12MA	311	547
0.6/2MA	508	312
6/12AC	977	264
6/2AC	862	286
0.6/12AC	1178	875
0.6/2AC	939	1135

Speciaal de graften 0.6/12AC en 0.6/2AC geven goede resultaten.

4-10-7